

· 基础研究 ·

嗅鞘细胞移植对实验性变态反应性脑脊髓炎髓鞘修复及运动功能的影响*

郭守刚¹ 靳峰² 汪春娟¹ 唐洲平¹ 陈寒¹ 张苏明¹

摘要 目的: 观察嗅鞘细胞(OECs)对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)的髓鞘修复的意义。**方法:** 培养、纯化 OECs 后, 移植组将 OECs 悬液注入 EAE 大鼠的侧脑室; 假手术组按以上方法注入等量生理盐水; 观察二组大鼠运动功能评分、组织病理学变化以及神经元细胞凋亡表达情况。**结果:** OECs 移植组运动功能评分显著优于假手术组, 差异有显著意义 ($P < 0.05$); 组织病理切片可见嗅鞘细胞移植组髓鞘修复明显优于假手术组; OECs 移植组在各时间点上神经细胞凋亡的表达均明显低于假手术组, 差异有显著意义 ($P < 0.05$)。**结论:** OECs 移植可以促进自身免疫性脑脊髓炎的髓鞘修复, 改善运动功能, 减少神经元细胞凋亡的程度, 对神经元有保护作用。

关键词 嗅鞘细胞; 移植; 实验性变态反应性脑脊髓炎

中图分类号: R49, R373.3+1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1242(2007)-01-0018-03

Effect of OECs transplantation on myeline repairment and motor function of experimental allergic encephalomyelitis/GUO Shougang, JIN Feng, WANG Chunjuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(1): 18-20

Abstract Objective: To develop a method for the culture of olfactory ensheathing cells (OECs) and to evaluate the therapeutic effect of OECs transplantation on experimental allergic encephalomyelitis (EAE). **Method:** OECs were cultured in the olfactory bulb of newborn Wistar rat. OECs suspension was infused into the lateral cerebral ventriculus of EAE rats, and the saline with the same quantity was infused in pseudo-operation group. Afterwards, motor-function grade, histo-pathological change and expression of apoptosis of neuron were observed. **Result:** The motor-function grade of OEC transplantation group was significantly higher than that of pseudo-operation group ($P < 0.05$). Myeline repairment of OEC transplantation group was markedly better than that of controls in histo-pathological slices. The expression of apoptosis of OEC group was statistically lower than that in the controls at every observation time point ($P < 0.05$). **Conclusion:** OECs transplantation may promote myeline repairment of EAE, improvement of motor function and decrease of neuron apoptosis.

Author's address Dept. of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words olfactory ensheathing cells; transplantation; experimental allergic encephalomyelitis

实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) 是一种主要由 CD4+Th1 细胞介导的变态反应性疾病, 其发生后表达的大量神经抑制生长因子被认为是疾病发生后髓鞘再生不良的重要原因^[1]。作为克服局部抑制因子的治疗策略, 应用细胞移植来促进神经髓鞘再生, 成为近年攻克 EAE 的研究热点。

本研究通过嗅鞘细胞 (olfactory ensheathing cells, OECs) 悬液注入自身免疫性脑脊髓炎大鼠的侧脑室, 探讨 OECs 移植对 EAE 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 嗅鞘细胞的原代培养

取新生 Wistar 大鼠嗅球消化后吹打成单细胞

悬液, 以在 2×10^6 个细胞/ml D/F-12S 的培养瓶中, 放入 37.0℃、5%CO₂、95% 的空气中的培养箱中培养。

1.2 嗅鞘细胞的纯化培养与传代

接种细胞在 D/F-12S 培养 3d 后, 换无血清纯化培养液, 依据细胞生长情况每 2—3d 半量换液, 细胞长满瓶底后传代。根据细胞培养的数量绘制生长曲线。

1.3 嗅鞘细胞免疫学鉴定

对纯化培养的细胞选择 P⁷⁵ 抗体作免疫组化染

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570628)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科, 武汉, 430030

2 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科

作者简介: 郭守刚, 男, 博士研究生, 主治医师, 在济宁医学院工作
收稿日期: 2006-05-29

色,如染色阳性则证实为 OECs。

1.4 嗅鞘细胞的标记

将培养 10—14d 的 OECs 消化成细胞悬液,以 10 μ g/ml 的浓度加入双苯甲胺 (Hoechst33342, Sigma),标记 OECs 细胞核。通过细胞计数,使细胞浓缩到 50,000 个/ μ l。

1.5 EAE 模型制作

健康豚鼠麻醉处死后,取出脊髓制成 50% (w/v) 的生理盐水匀浆。与等量的福氏完全佐剂混合,制成油包水剂。86 只 Wistar 大鼠双侧后足跖皮内分别注射油包水剂 0.2ml,诱导产生 EAE。其中 72 只成功诱导,8 只症状不明显,属诱导失败;6 只因诱导后症状过重,最终死亡。

1.6 动物分组

体重 230—250g 的雄性 Wistar 大鼠 72 只,随机分为嗅鞘细胞移植组 36 只、假手术组 36 只。

1.7 嗅鞘细胞的移植

在模型制备后的第 7d 行嗅鞘细胞移植。干细胞计数后将其浓度调整为 1 \times 10⁷ 细胞/1000 μ l。将大鼠麻醉、固定,取中线左侧 1.6mm、冠状缝前 1.0mm 为中心开骨孔,头皮针垂直进针,在进入 3.6mm 后各缓慢推入细胞悬液 2 μ l 于侧脑室。留针 10min 后缓慢拔针。假手术组按以上方法注入等量生理盐水。

1.8 运动功能评分

免疫注射的 Wistar 大鼠从注射起观察体重并从发病起按临床严重程度予以评分,评分标准参见文献^[2]。0 分为不发病,1—3 分为轻度,4 分为中度,5—9 分为重度发病。

1.9 病理标本制备

取发病不同时间点(1、3、7、10、14、21d)大鼠脑和脊髓,固定于 10% 中性甲醛溶液,石蜡包埋,切片,分别作 Hoechst 标记细胞的观察。

1.10 TUNEL 方法测定神经细胞凋亡

切片制作同上,操作按说明书进行。TUNEL I 液和 TUNEL II 液(带荧光素的 X-dUTP)按 1:9 比例,快红显微镜下监测显色。被标记的凋亡细胞呈棕黄色,阳性对照用 1mg/L DNA 酶 I 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,缓冲液中含有 50mmol/L Tris,10mmol/L MgSO₄,0.1mmol/L DTT,蒸馏水冲洗。阴性对照:微波修复抗原,相似切片以磷酸盐缓冲液代替 DNA 末端标记中的末端脱氧核苷酸转移酶及生物素标记的 dUTP。

1.11 实验结果判定与统计学分析

神经细胞凋亡:细胞核内有棕黄色颗粒为阳性;排除脑组织坏死区,各组切片均选自脑及脊髓相同

解剖位置,观察 5 个高倍镜视野 (10 \times 20 倍) 计算 1mm² 面积中阳性细胞数的平均值。数据间比较用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有显著性意义,应用 SPSS11.5 统计软件进行数据统计学分析。

2 结果

2.1 OECs 的培养及生物学特性

2.1.1 原代培养观察: OECs 在接种时细胞呈圆形,折光性好(图 1, 见后置彩色插页 1),2h 后有细胞开始贴壁,2d 时大部分细胞呈圆球形,3d 时多数细胞胞体发亮、呈三角形、梭形,5—6d 时大部分细胞呈双极或三极,胞体立体感强,折光性好。7—8d 时细胞密度增大,此时细胞突起变得更加纤细,9—10d 时细胞长满瓶底,细胞排列方向一致,细胞间相互融合。

2.1.2 嗅鞘细胞免疫组化染色结果: 选择 P⁷⁵ 抗体作鉴定。图 2(见后置彩色插页 1)示 OECs 2—18 代均抗 P⁷⁵ 阳性。说明培养的细胞为 OECs。根据统计分析第 2 代—18 代的 OECs 的纯度为 95%—98%, 可以作为移植用的种子细胞。

2.2 EAE 大鼠发病情况及其评价

2.2.1 发病情况: 在行为学表现方面,EAE 组免疫 Wistar 大鼠 72 只,在接种后 5—7d 多出现活动减少,食欲下降,毛发失去光泽。一般在诱导后 7—10d 发病,表现为尾部张力降低,双后肢瘫动物以前肢向前爬行时剑突以后部分着地,双后肢拖拉在后,足跖面朝上,尾张力消失,可伴大小便失禁。

2.2.2 实验各组动物运动行为学评分: 嗅鞘细胞移植组在各时间点的运动行为学评分与假手术组相比明显降低,差异有显著意义(*P*<0.05,见表 1)。

2.2.3 实验各组动物神经组织切片的病理学变化: 假手术组 HE 染色可见大脑、脑干白质区血管周围,尤其是小静脉周围有大量单核细胞和淋巴细胞浸润,形成典型的血管“套袖样”改变;髓鞘染色可见脑室周围白质片状不对称脱髓鞘,小静脉周围尤为明显(图 3, 见后置彩色插页 1)。而嗅鞘细胞移植组大鼠未见明显的上述病理变化,提示嗅鞘细胞能够使脱髓鞘的神经纤维的髓鞘修复(图 4, 见后置彩色

表 1 实验各组动物各时间点运动行为学评分 ($\bar{x}\pm s$)

动物数	运动行为学评分		神经细胞凋亡数(个/mm ²)		
	假手术组	嗅鞘细胞移植组	假手术组	嗅鞘细胞移植组	
1 天	6	8.1 \pm 2.1	6.8 \pm 1.7 ^①	7.5 \pm 1.2	5.1 \pm 0.8 ^①
3 天	6	7.2 \pm 1.9	6.5 \pm 1.3 ^①	31.8 \pm 2.9	8.23 \pm 1.3 ^①
7 天	6	6.3 \pm 1.7	4.5 \pm 0.8 ^①	53.5 \pm 5.3	13.23 \pm 2.5 ^①
10 天	6	5.2 \pm 1.1	3.0 \pm 0.6 ^①	76.82 \pm 6.1	19.2 \pm 2.7 ^①
14 天	6	3.5 \pm 0.7	2.1 \pm 0.3 ^①	55.13 \pm 4.4	11.25 \pm 1.9 ^①
21 天	6	3.3 \pm 0.6	0.9 \pm 0.2 ^①	36.4 \pm 3.1	10.3 \pm 1.5 ^①

① 组间比较 *P*<0.05

插页 1)。

2.2.4 Hoechst 标记的 OECs 在体内的特点: 在荧光显微镜下, 以紫外光激发移植组切片, 发现嗅鞘细胞移植组侧脑室旁、脑干及脊髓白质区有大量荧光颗粒, 这是 Hoechst 标记的 OECs 细胞核, 这说明大量 OECs 移植存活。观察还发现 OECs 植入后, 细胞从侧脑室旁迁出, 并广泛分布。假手术组没有发现这些荧光颗粒。

2.2.5 神经细胞凋亡的表达情况: 各组在各时间点均出现神经细胞凋亡的表达, 其中嗅鞘细胞移植组的表达在各时间点上明显低于假手术组 (见表 1), 差异有显著意义 ($P < 0.05$) (见图 5—6, 见后置彩色插页 1)。

3 讨论

本实验用完全弗氏佐剂免疫的 Wistar 大鼠发病时间集中在免疫后 7—10d, 发病高峰在第 9d 左右, 第 18d 左右开始恢复, 本组动物模型的病情与文献报道相符^[3]。本实验发现大鼠 EAE 的病理变化以中枢神经系统白质中血管周围单核细胞的浸润为主, 并伴有明显的神经脱髓鞘, 呈“血管袖套样”改变 (图 2), 与文献报道相符^[4]。嗅鞘细胞移植组大鼠未见明显的上述病理变化, 提示嗅鞘细胞能够使脱髓鞘的神经纤维复髓鞘。

OECs 对于脱髓鞘疾病修复髓鞘作用, 可能与以下因素有关^[4-5]: ①OECs 形成的髓磷脂在生化特点上属于周围性的髓磷脂鞘膜, 较之中枢性髓磷脂不易受星形胶质突起的影响, 在损伤后的 CNS 中具有特征性的与具有星形细胞的宿主环境进行整合的能力。②OECs 拥有雪旺氏细胞和星形细胞两种特性, 它们表达神经生长因子、胶质原纤维酸性蛋白、碱性髓鞘蛋白等大量营养因子, 这些蛋白和因子均能促进轴索的生长和髓鞘的再生, 帮助 OECs 同轴索紧密相连, 包绕轴索穿越 CNS 不利的再生环境, 从而起到修复髓鞘的作用。另外, OECs 有着明显的迁移能力, 这在治疗脱髓鞘疾病时至关重要, EAE 病变呈多灶性损害, 这就要求被移植的细胞不仅要在病灶内迁移, 而且要在灶间迁移, 以避免进行多点细胞注射。OECs 形成的髓磷脂在生化特点上属于周围性的髓磷脂鞘膜, 较之中枢性髓磷脂不易受星形胶质突起的影响, 在损伤后的中枢神经中具有特征性的与具有星形细胞的宿主环境进行整合及迁徙的能

力。OECs 注入侧脑室后, OECs 可随脑脊液循环迁徙至脊髓脱髓鞘区域发挥作用^[5], 因此, 脊髓脱髓鞘区域也得到修复。

本研究表明: 各组在各时间点均出现神经细胞凋亡的表达, 其中嗅鞘细胞移植组的表达在各时间点上明显低于假手术组, 差异有显著意义 ($P < 0.01$)。该结果提示, 在 EAE 脱髓鞘损伤后进行嗅鞘细胞移植, 起到抗凋亡和保护神经元的作用。最新离体研究已发现 γ 干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 能介导神经元和少突胶质细胞凋亡, 是其产生脱髓鞘的重要方式^[6-7]。OECs 移植减轻神经细胞凋亡的机制可能与 IFN- γ 和 TNF- α 的抑制有关。OECs 在与宿主细胞融合后产生的神经生长因子对 TNF- α RNA 及 IFN- γ RNA 的表达有较强的抑制作用, 能有效阻滞 TNF- α 合成分泌及其细胞毒性, 从而抑制神经细胞凋亡, 起到保护神经元的作用^[8]。

综上所述, 嗅鞘细胞移植对于自身免疫性脑脊髓炎后的髓鞘修复, 减轻神经元受损程度有着重要作用, 以上结果将为进一步运用细胞移植治疗此病提供了新的策略和依据。

参考文献

- [1] Stangel M, Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis[J]. Prog Neurobiol, 2002, 68(5): 361—376.
- [2] Ducker HJ, Van-dokkum RP, Verhaagen J, et al. Functional and neurophysiological evidence of the efficacy of trophic pharmacotherapy using an adrenocorticotropic hormone 4-9 analog in experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis[J]. Neuroscience, 1996, 71(2): 507—521.
- [3] 周璟, 张家胜, 马宝骊, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠模型的建立[J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22(1): 16—25.
- [4] Ramon-Cueto A, Avila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function[J]. Brain Res Bull, 1998, 46(3): 175—187.
- [5] Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, et al. Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord[J]. J Neurosci, 1998, 18(16): 6176—6185.
- [6] 胥少汀. 脊髓修复的有关问题[J]. 中国康复医学杂志, 2002, 17(4): 252—254.
- [7] 张强, 廖维志. 大剂量甲基强的松龙对脊髓损伤后脊髓细胞凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2000, 15(4): 218—220.
- [8] Bright JJ, Sriram S. Immunotherapy of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system[J]. Immunol Res, 2001, 23(2—3): 245—252.